

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-509367

(P2000-509367A)

(43) 公表日 平成12年7月25日 (2000.7.25)

(51) IntCl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 6 1 K 38/44		A 6 1 K 37/50	
A 2 3 C 9/00		A 2 3 C 9/00	
A 2 3 G 1/00		A 2 3 G 1/00	
A 2 3 L 2/52		A 6 1 K 9/20	
A 6 1 K 9/20		31/00	6 0 1 B
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願平9-526782	(71) 出願人	センベル アクツィエボラーグ スウェーデン、エス-105 46 ストック ホルム、トルスガタン 14
(86) (22) 出願日	平成9年1月22日 (1997.1.22)	(72) 発明者	クラエソン、カール、オロフ スウェーデン、エス-755 94 イュブサ ラ、ヴァクハラ スラフスタ
(85) 翻訳文提出日	平成10年7月21日 (1998.7.21)	(72) 発明者	リンデヴォルド、ギュスタフ スウェーデン、エス-186 50 バレンツ ユーナ、リュンリスターパーゲン 17
(86) 国際出願番号	P C T / S E 9 7 / 0 0 0 9 8	(74) 代理人	弁理士 佐々木 宗治 (外3名)
(87) 国際公開番号	W O 9 7 / 2 6 9 0 8		
(87) 国際公開日	平成9年7月31日 (1997.7.31)		
(31) 優先権主張番号	9 6 0 0 2 3 3 - 2		
(32) 優先日	平成8年1月23日 (1996.1.23)		
(33) 優先権主張国	スウェーデン (S E)		

(54) 【発明の名称】 ヘリコバクタピロリ感染の治療用医薬を製造するためのラクトベルオキシダーゼ、ベルオキシド
ドナーおよびチオシアネートの使用

(57) 【要約】

口腔、喉および胃中に存在するヘリコバクタピロリ菌により引き起こされる感染の生体内での予防または治療処
置ための調製品であって、抗菌レベルでのチオシアネー
トの存在により、そして最終的にはラクトフェリンの存
在下で完成させられる調製品を作る際の、ラクトベルオ
キシダーゼおよびベルオキシドドナーを含む抗菌物質の
使用に関する。ヒトに対する治療のためには、該調整品
を1.2~1.6グラムずつ一日三回に分けて投与する。

【特許請求の範囲】

1. 口腔、喉および胃中に存在するヘリコバクタピロリ菌により引き起こされる感染の生体中での予防または治療処置の調製品であり、抗菌レベルでのチオシアネートの存在により完全となる調製品であって、ラクトペルオキシダーゼおよびペルオキシドドナーを含む抗菌物質の調整品。
2. 口腔、喉および胃中に存在するヘリコバクタピロリ菌により引き起こされる感染の予防または治療処置のための、ラクトペルオキシダーゼ、グルコース、グルコースオキシダーゼおよびチオシアネートを含む請求項1記載の抗菌物質の調整品。
3. 口腔、喉および胃中に存在するヘリコバクタピロリ菌により引き起こされる感染の生体中での予防または治療処置のための、ラクトペルオキシダーゼ、グルコース、グルコースオキシダーゼおよびチオシアネートを含み、ラクトバシルスがペルオキシドドナーとして用いられる請求項1または2記載の抗菌物質の調整品。
4. 口腔、喉および胃中に存在するヘリコバクタピロリ菌により引き起こされる感染の生体中での予防または治療処置のための、ラクトペルオキシダーゼ、グルコース、グルコースオキシダーゼおよびチオシアネートを含み、チオシアネートが植物、好ましくはブラシカシーエ科、例えばブラシカ属とシナオイスイ属の種の第二代謝物から形成される請求項1、2または3のいずれかに記載の抗菌物質の調整品。
5. 前記調整品が錠剤の形にあり、経口で投与されるものである前記各請求項のいずれかに記載の抗菌物質の調整品。
6. 前記調整品がその投与の直前に液体中に溶解されることにより活性化される乾燥粉末の形にある前記各請求項のいずれかに記載の抗菌物質の調整品。
7. 前記調整品が一日につき2～3回に分けて取られる水中、乳中、培養乳製品中あるいはチョコレート飲料中において、ポリッジを形成するために溶解されることにより活性化される乾燥粉末の形にある請求項1～5いずれかに記載の抗菌物質の調整品。

8. 前記調整品が抗菌効果を高めるためのラクトフェリンの添加によりさらに完全にされる前記各請求項のいずれかに記載の抗菌物質の調整品。

9. ヒト治療のため、一日用量8~400mgのチオシアネートまたは10~500mgのペルオキシドドナーに相当する量の前記各請求項に記載の調整品を投与する方法。

10. 一日三回取られる乳、ヨーグルト、あるいはチョコレート飲料等中のポリッジと混合された前記各請求項の調整品を一回につき1.2~1.6グラムの用量で投与する方法。

【発明の詳細な説明】

ヘリコバクタピロリ感染の治療用医薬を製造するためのラクトペル

オキシダーゼ、ペルオキシドドナーおよびチオシアネートの使用

技術分野

本発明は、胃粘膜に見られ、胃潰瘍に関連したヘリコバクタピロリ菌の感染に対して効果を発する抗菌物質の調整品に関するもので、公知の抗菌物質の利用に関連する。

本発明の目的は、ヒト胃粘膜に存在し、かつヒト胃粘膜の細胞間および細胞内に存在し、潰瘍における炎症（胃潰瘍疾患）に関係することがわかっている螺旋形のグラム陰性菌であるヘリコバクタピロリ微生物と戦うための可能性を示唆することである。

さらに別の特徴が以下の詳細から明らかとなるだろう。

発明の背景

乳の新鮮さを延長するためにラクトペルパオキシダーゼ酵素にチオシアネートとペルオキシドドナーとを組合せて用いることが知られている。例えば、「ダイアログインフォメーションサービス、ファイル5、ピオシス、ダイアログアクセッションNo. 7195912」の刊行物で述べられているように、下痢および他の腸の病気に対して胃腸系中で活性のある抗菌組成物を作ることによって、カンピロバクタ属のある種の細菌を同ラクトペルオキシダーゼ物質で処理することも知られている。同物質はカンピロバクタ ジジュニ (*Campylobacter jejuni*) とカンピロバクタコリ (*Campylobacter coli*) に対して活性のある効果を有することが示されている。EP特許0 397227はリステリア菌の処置のために類似の種類のラクトペルオキシダーゼ物質の使用を記載する。

該組成物中に用いられるラクトペルオキシダーゼ酵素は、牛乳から、またはより一般的には乾燥乳製品から得られ単離される。安定性からの観点から該酵素は6.5未満、例えばpH3.25～6のpH値を有することが重要である。

チオシアン酸ナトリウムは一般的にチオシアネートの原料として用いられてきた。もしくは、植物、好ましくはブラシカシーエ (*Brassicaceae*) 科内のもの、

例えばブラシカ (Bassica) 属の種 (ケール等のキャベツ種) およびシナピス (Sinapis) (例えばカラシナの種子) の第二代謝物から形成されたチオシアネートを用いることができる。存在する植物ペルオキシダーゼが不活性化されるように植物原材料が熱処理されることが重要である。

ペルオキシドドナーは保存的性質を延長するための目的から、特に乳処理のためにグルコース-グルコースオキシダーゼおよび固体過酸化化物等の異なる過酸化物生産システムを用いてきた。胃腸管環境では酸素減少条件があるために、アルカリ過炭酸塩 (ナトリウム過炭酸)、土類アルカリ過酸化物 (過酸化マグネシウム) および他の固体過酸化物 (過酸化カルバミド) 等のペルオキシドドナーが胃腸管での抗菌使用のために用いられてきた。

本発明による抗菌物質の調整品は、特に粉末または錠剤の形で消費すべき時まで不活性な状態で保存され、およびその消費直前に液体中で再活性化されることも、該調整品が短時間 (例えば1~24時間) のみ活性があるので重要である。

該調整品におけるラクトフェリンの添加はヘリコバクターピロリに対して抗菌効果を増加することも示されている。

カンピロバクターはヘリコバクター属として現在知られている細菌にわずかに関連性があると以前考えられた細菌である。およそ1983~1984年に、胃炎および胃潰瘍、最終的には胃癌さえも引き起こすと思われたカンピロバクター細菌が単離され増殖させられた。該細菌はカンピロバクターピロリデイスの名称が最初に与えられたが、この名称は1987年にヘリコバクターピロリに改められた。より正確な特性付けは、単離された該細菌がカンピロバクタータイプの他の細菌から強く異なることを後に証明し、1989年以降、問題の細菌はそれ自体の属が与えられ、ヘリコバクターと名付けられた。

各細菌の消化系を攻撃する方法および各細菌が攻撃する消化系の場所に関してカンピロバクターとヘリコバクターの間には大きな違いが存在する。1989年10月の刊行物「International Journal of Systematic Bacteriology」の397~405ページにおいて、現在ヘリコバクターピロリ属である細菌はカンピロバクター属には実際に属さないこと、およびそれは例えば微細構造および形態、細胞の脂肪酸、メナ

キノン類、増殖特性および酵素能力に関してカンピロバクタとは顕著に異なり、さらにそれに加えて抗生物質感受性がカンピロバクタの場合と異なることが述べられている。

カンピロバクタによる感染が小腸の最初の場所で炎症を引き起こす散発的腸炎の最も共通する理由の一つであることが幾つかの試験で示されている。恐らく、この感染は腸粘膜のコロニー化を経て始まる。逆に、カンピロバクタは心室粘膜に感染する証拠は存在しない。通常、カンピロバクタの感染は医学処置を必要としない。感染は通常医学処置なしにそれ自体で消失する。しかし、カンピロバクタの感染により引き起こされた深刻な大腸炎がある場合、感染は抗生物質、例えばノルフロキサシンまたはエритроマイシンを用いて現在治療されている。そのような治療は下記の記載から明らかとなるように、ヘリコバクタピロリの感染の治療とはかなり異なり、各細菌の予防または治療処置は両立できない。

逆に、多くの研究はヘリコバクタピロリによる感染と胃炎、胃粘膜および胃癌との明らかな関連性が存在することを証明した。感染を得る危険性はその後の老化で高まり、とりわけ胃の粘膜層に見られるヘリコバクタピロリ菌に約50歳の人口の40～50%が感染していることが研究によって証明された。

カンピロバクタ菌のみが粘膜の外部層を攻撃すること、およびカンピロバクタ菌が口腔、食道または喉、胃、および少なくとも感染を引き起こすことなく胃に最も近く置かれている腸システムの部分を通ることが明らかである。

この状況は、ヘリコバクタピロリ菌に関して実際に反対であり、つまり細菌は口腔内、喉中およびとりわけ胃内に見られてその感染を引き起こし得る一方で、該細菌は腸システムを攻撃しない。したがって、その理由は、ヘリコバクタは胃の細胞間、さらに胃粘膜細胞中に浸透し、該細胞を細胞内で攻撃するからであり、該細菌は胃粘膜の厚い層の下でそれ自体を保護することができるからである。上記の細胞内浸透に基づいて、該細菌は抗生物質の作用に対しても保護されている。細菌が細胞内に浸透するとの証拠は例えば「Journal of Clinical Pathology」47巻、699～704ページ、Noach ロサンジェルス、の「ヘリコバクタピロリと胃粘膜および十二指腸粘膜との会合の電子顕微鏡研究」に見られる。

粘膜の厚い層の下で細菌がそれ自体を保護して胃粘膜中で細胞内に現れる能力

および胃内での酸性環境がある種の抗菌物質に悪影響を与える事実は、ヘリコバクタピロリ菌の試験管内での除去に関するデータが生体内の状況に移すことができないとの結論を導いている。

「Manual of Clinical Microbiology」第6版、P. Murray、E. Baron、M. Pfaller、F. Tenover、R. Tenover、ASMプレス、ワシントン、1995年、の出版物には、ある種の物質の胃酸性環境下での非活性に依存して、多くの実験室的な試験が、ヘリコバクタピロリの感染を、生体内で治療することはできないことを示したことが述べられている。

「Läkartidningen」の記事の中には(4268~4271ページ)、ヘリコバクタピロリは多様な抗菌物質に試験管中で影響されることが述べられている。これにもかかわらず、この微生物を撲滅することは困難である。この細菌は胃の厚い粘膜の下でよく保護されており、抗生物質が十分に浸透しない。その代わりにそのようなヘリコバクタ感染症は、例えば14日間、ビスマス塩、メトロニダゾールおよびアモキシシリンまたはテトラサイクリンの組合せによるいわゆる三重治療によりある程度の成功をもって治療されてきた。しかし、メトロニダゾールに対して高まる耐性が報告されており、これは次に代用となる治療に対する必要性を高めたと報告されている。

ヘリコバクタピロリは血清学的に他の細菌と交差反応するのは非常に稀である点でもこの細菌はかなり独特である。ヘリコバクタピロリの感染は産業発展国よりも発展途上国の方が一般的に存在しており、このことは、この細菌は川の水の中で一週間を超えて生存するので、最終的には衛生水条件の困難さに依存するだろう。

現在知られている限り、ヘリコバクタピロリは主に心室粘膜のみに感染することができ、通常は洞内で胃炎を生じさせる。ヘリコバクタピロリはタンパク質を介して粘膜の炭素含水化合物に結合する。その後細菌は細胞間に侵入し、そしてまさにその細胞へ侵入し、尿素をアンモニアと酸性炭酸塩に分解するウレアーゼを分泌することにより、胃中の塩酸を中和し、それによって細菌は非常に低いpHに対して自らを保護する。アンモニアは上皮細胞壁に対して毒性があり、粘膜構造を変化させ、これにより細菌は細胞を細胞内で攻撃する。さらに、細菌は、

タンパク質を分解し、粘膜を肥らせ傷つけるプロテアーゼを分泌する。感染に対する患者の反応は近隣細胞に対して傷を与えるが、細菌の損傷は引き起こさない。局所的なホルモン障害は酸の増加生産を導く。

十二指腸潰瘍に苦しむほとんどすべての患者について、ヘリコバクターピロリ菌により誘導された胃炎を調べることができる。実際、胃潰瘍に苦しむ患者の60～80%はヘリコバクターピロリ菌により感染を受けているが、その関連性は十二指腸潰瘍に関するよりも小さい。

上記のように、ヘリコバクターピロリによる感染はこれまでビスマス (bismuth)、メトロニダゾール (Metronidazol) およびその代りにアモキシシリン (Amoxicillin) またはテトラシクリン (Tetracyclin) による治療等の三重治療、またはH2レセプターブロッカーおよび二つの抗生物質を用いた治療により治療されてきた。先に示された治療は不十分な結果を与え、しばしばいくつかの悪影響をもたらす。後に示された治療は60～80%の治癒を与える。

一方、現在、抗生物質耐性品種の発生の危険性を伴う抗生物質の利用に関して、抗生物質の使用を制限する見解が存在する。したがって、別の形の治療が望まれている。

本発明の詳細な説明

これまで抗生物質による治療を含めて上記の三重治療を用いる以外は、ヘリコバクターピロリに対する単純で効率的な処置は存在しなかった。

したがって、口腔、喉、および、とりわけ胃内に存在するヘリコバクターピロリにより引き起こされた感染の治療のために、さらに胃粘膜の細胞内感染に対する治療のための調製品を作るために、本発明にしたがって、ラクトペルオキシダーゼ (lactoperoxidase)、チオシアネート (thiocyanates) およびペルオキシドドナー (peroxide donor) を含む抗菌物質を用いることにより、最初に言及された種類のラクトペルオキシダーゼを使って、ヘリコバクターピロリの感染と戦うことができることが示されたことは非常に興味深い。

多様な細菌を試験管内で治療することはしばしば可能であるが、同細菌を生体内で治療することは困難もしくは不可能となり得る。多様な抗菌物質を用いてヘ

リコバクタピロリを試験管内で治療することができる。それにもかかわらず、抗生物質による上で示した三重治療を用いてさえも細菌を撲滅することは困難である。そのような治療後でさえ、病気再発頻度は高い。したがって、上記のラクトペルオキシダーゼが生体内でヘリコバクタピロリの治療に効果的であることが証明され、したがって抗生物質に対する耐性発現の危険なしに長期治療が可能であることはさらに驚くべきことである。

本発明は医薬品を提供し、その使用は耐性菌株の増殖の危険を排除する。

本発明は生育培地中において、試験管内で最初に以下のようにテストされた：25mlブルセラブロス (pH7.4) +0.1mlヘリコバクタピロリ菌株NCTC11637を3本のフラスコ中で混合した。細菌を微好気性環境中で48時間増殖させた。その後、48時間後に各フラスコに以下のものを加えた：

- 1.比較物、無添加；
- 2.チオシアネート、35mg/l；
- 3.ラクトペルオキシダーゼ-グルコース-グルコースオキシダーゼ-チオシアネート、50mg/lラクトペルオキシダーゼ(25U/ml； 4.5g/lグルコース； 6.1mg/lグルコースオキシダーゼ(200U/mg)；35mg/lチオシアネート。

そして、以下のデータが得られた：

表1

試験番号	0 log10cfu/ml	24時間
比較物	7.3	7.2
2	8.5	8.3
3	8.3	0

試験管内で得られた結果は、ヘリコバクタピロリ菌の完全な撲滅が本発明の調整品が添加されてから0～24時間後に得られたことを示している。

さらに、本調整品によるヘリコバクタピロリ菌を細胞内で撲滅する可能性を発

見するためにテストが行われた。

ヘリコバクタピロリの細胞内撲滅による試験

細菌は、ブルセラブロス (pH6.0) で2日間増殖させたヘリコバクタピロリ菌株M:72である。

テストの中では、ヒト外皮細胞系HEp-1の細胞に12時間感染させた。余分な細胞細菌をゲンタマイシン (50mg/l) を用いて殺し、多様な物質を加えた。細胞を0.6時間後と24時間後に可溶化した。同封された図1の図表中の曲線Kを参照されたい。この図において、曲線は以下の物質に関して示されている：

2. グルコースオキシダーゼ+ラクトペルオキシダーゼ+グルコース+SCN (活性チオシアネート) ；

3. MgO₂+ラクトペルオキシダーゼ+グルコース+SCN ；

5. グルコースオキシダーゼ+ラクトペルオキシダーゼ+グルコース+SCN+ラクトフェリン。

図1から明らかなように、すべてのヘリコバクタピロリ菌は上記物質2、3および5のすべてにおいて駆除された。これは、この物質が細胞中に入り、すべてのヘリコバクタピロリ菌を細胞内で殺すことを示している。

液体に溶解されている場合、本調整品により形成される活性成分は細胞中に侵入することができ、ヘリコバクタピロリ菌を殺すことができることが明白である。

本物質はマウスモデルおよびヒトの体の生体内でも試験された：

マウスでの研究

このモデルにおいて、上記のラクトペルオキシダーゼ物質が試験された。さらに、ラクトフェリンがこの物質の効力を増すかどうかを調べるために、同じ抗菌物質がラクトフェリンを用いて調べられた。

方法：30マウスをヘリコバクタピロリに感染させた；細菌を加えてから7日後に、マウスが実際に感染されたことをチェックした；これは、ヘリコバクタピロリの増殖とPCR技術による立証により行われた。

その後、マウスを3グループ (1比較グループと2試験グループ (各グループに

つき10マウス)) に分けた ; 該試験グループの第一グループのマウスは上記の抗菌ラクトペルオキシダーゼ物質が与えられ、第二試験グループのマウスはラクトフェリンにより完全にした同物質が与えられた。

ラクトペルオキシダーゼ、グルコース、グルコースオキシダーゼおよびチオシアネートを含む抗菌物質を加えた。その物質を乾燥した形で供給し、水に溶解し、一回につき0.1mlを一日三回、7日間にわたって投与した。その後、胃中の増殖とPCR分析の両方によりマウスのヘリコバクターピロリの存在の新しい分析を行った。

結果 : この結果は、比較グループ中の10匹のうち8匹のマウスがまだヘリコバクターピロリのコロニー化を受けたことを示した。マウスに抗菌物質が与えられた最初の試験グループにおいて、10匹のうち7匹が増殖陰性で、ヘリコバクターピロリ菌が効果的に殺されたことが示され、マウスにラクトフェリンで完全とされた抗菌物質与えた第二試験グループにおいては、10匹のうち8匹が増殖陰性であった。

これらの結果は、該抗菌物質がヘリコバクターピロリ菌を生体中でも駆除できることを示した。このことは、胃粘膜中の粘膜層下で自らを保護し、胃粘膜中の細胞内および細胞間に存在する細菌の独自性を考慮すれば、予想しえないものであった。

ヒトでの研究

7人がこの研究に選択された。すべての被試験者はヘリコバクターピロリに感染したことが所謂「尿素呼吸試験」により示された。

被試験者に上記の抗菌物質が5日間能動的に与えられ、それと同時にLOSEC (登録商標 ; オーストリア) が酸抑制剤として与えられた。抗菌物質は、ポリッジ、乳、ヨーグルトおよびチョコレート飲料等の多様な製品中に含ませた。該ポリッジは一日三回取られ、食間として乳、ヨーグルトまたはチョコレート飲料が交互に取られた。

尿素呼吸試験は抗菌物質が投与される直前およびその5日後に行われ、その間抗菌物質を含有する製品が取られた。

その結果は以下の表2および添付の図2に示されている。ヘリコバクターピロリによる感染は6人の被試験者に関して顕著に減少した。感染の減少が観察されなかった感染の7人目は始めからすでに非常に低いレベルの感染者であった。

表2

ヒト	1	2	3	4	5	6	7
治療前	1.97	1.7	1.36	0.87	0.72	0.54	0.21
治療後	0.45	0.42	0.67	0.29	0.34	0.06	0.36

上に示された結果は、ヘリコバクターピロリ菌を生体中で撲滅するために、酸分泌阻害剤と組合せられた二つの抗生物質による治療を用いることが現在まで必要であったという事実を考慮すれば、非常にセンセーショナルであり成功していると思わなければならない。尚、これまで実施されてきた非常に強い治療でさえ100%効果的ではなかった。

よって、細胞内試験、マウス試験およびヒト試験は、ラクトペルオキシダーゼ、グルコース、グルコースオキシダーゼおよびチオシアネートを含んだ抗菌物質は、試験管内のみならず生体内においても、ヘリコバクターピロリ菌を撲滅することができることを証明している。このことは、該細菌が胃粘膜における厚い粘膜層下で自らを保護して細胞内に侵入し、自らを抗生物質に対して保護する点で独自であるにもかかわらず可能なことが示された。

上記のラクトペルオキシダーゼはヘリコバクターピロリ菌株NCTC 11637に対して試験された。対応する試験はヘリコバクターピロリの他の菌株、すなわちVBG H、S

VA40、V44-2010、G57、17874 Vac-A、H:72および88-23に対して行われ、同じ良好な結果が得られた。

ヒト研究に関連して上で示されたように、純粋な医薬品等としてのみならず、多様な種類の食事等の食物として多様な調製品を用いてヘリコバクターピロリ菌の

感染を治療することも可能である。後者のタイプからは、チオシアン酸ナトリウム、ペルオキシドドナー、ラクトペルオキシダーゼおよびSCNが加えられた破碎小麦、脱脂乳粉末、大豆ミール、カゼイン酸カリウム、脂肪、繊維および乳化剤からなる小麦食事を調製することが可能である。多様な乳製品を利用し、それにペルオキシドドナーを加え、ペルオキシダーゼを作るラクトバシルスを含むある種の培養乳を用いることことも同じく可能である。乳を作る動物への特別な餌やりにより、乳中のチオシアネート含有の増加を提供することも可能である。

生成物の実例は、約1.2~1.6g用量の乾燥ラクトペルオキシダーゼ物質が3/4d1の水と混合され、一日三回食されるように調製されたポリッジである。；したがって代用物は、2d1の乳または2d1のヨーグルト中に混合された約1.2~1.6gの乾燥ラクトペルオキシダーゼ物質を含有して一日三回食される一人前パックを備えた飲料物である；さらに別の代用物は、インスタント溶液チョコレートと1d1の乳とに混合された同様に約1.2~1.6g用量から調製され、一日二回飲まれるチョコレート飲料である。

抗菌物質を含む医薬配合物を投与するときに、組成物は多くのチオシアネートを含有して胃腸管中でその濃度が少なくとも0.1mMとしなければならず、固体の水溶性ペルオキシドドナーまたは酵素システムの量を高くしてその濃度が少なくとも0.1mMの過酸化水素濃度を与えなければならない。ペルオキシドドナーとチオシアネートとの関係は4未満、好ましくは1~2である。ラクトペルオキシダーゼの量(50U/mg)はその濃度が少なくとも1mg/lであるようにする。

本発明に係る抗菌物質を含む医薬品を調製するときに、該医薬品は錠剤、ゼラチンカプセルまたは粉末等の経口調製品のいずれの形であってもよい。これによって、選択された物質は、ラクトース、サッカロース、ソルビトール、マンニトール等の固体粉末形のキャリアー、ジャガイモデンプン、トウモロコシデンプン、アミロペクチン、セルロース誘導体等のデンプン、またはゼラチン、およびス

テアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ポリエチレングルコースワックス等のある種の減摩物質、および錠剤を作ることができる同様なものと混合する。経口投与を容易にする被覆錠剤を提供することが望まれる場合には、

該錠剤は胃液によって溶解するポリマーまたは活性成分の胃液中の拡散を可能とするポリマーで被覆することができる。着色剤または調味物質を該ポリマーに加えることも可能である。

ゼラチンカプセル（ドロップ形成、閉鎖、硬または柔カプセル）を調製するときは、活性化化合物を植物油と混合する。カプセルは、ラクトース、サッカロース、ソルビトール、マンニトール等の上記タイプの固体キャリアー、ジャガイモデンプン、トウモロコシデンプン、アミロペクチン、セルロース誘導体等のデンプン、またはゼラチンと組合せられた活性成分の顆粒を含有してもよい。さらに顆粒は分離顆粒を破壊する分解物質を含有することでさらに迅速な放出およびさらに迅速なその溶解を提供する。

経口投与用液体調製品はシロップまたは懸濁液の形、例えばエタノール、グリセロールまたはプロピレングリコールとともに0.2～20重量%の上記の活性物質を含有する液体の形で存在してもよい。それにより、ペルオキシドドナーは投与前にその放出を妨げるマイクロカプセル化された製品の形で添加される。

錠剤調製方法およびゼラチンカプセル充填のための顆粒調製方法も当業者によく知られている慣用の技術にしたがって行われた。

経口投与のための活性物質の一日の投与量は変更され、これは投与のタイプに依存するが、概して投与量は、チオシアン酸ナトリウムに関して一日8～400mgおよび過炭酸ナトリウムに関して一日10～500mgである。

以下の表3は多様な調製品タイプの使用に適する活性成分の量の一般的な見解である。

表3

ラクトペルオキシダーゼ (25 U/mg)	5~150 mg/l
グルコース	少なくとも0.5 g/l*
グルコースオキシダーゼ	2.0~15 mg/l*
チオシアネート	3~50 mg/l

*) グルコースーグルコースオキシダーゼはペルオキシドナーである。しかし、グルコースは、グルコースオキシダーゼがペルオキシダーゼを提供できる量で存在しなければならない。2.0~15mg/lグルコースオキシダーゼの量は5~8.5ml/lのグルコースに相応する。反応の際に等量の過酸化水素を与える固体ペルオキシドドナーを加えることもできる。さらに、ペルオキシドを作るラクトバシルス株はペルオキシドを作るために用いることができる。

ラクトペルオキシダーゼは純粋な製品、乳粉末、または乳しよう製品として加えられる。グルコースオキシダーゼは、一般的に、増殖しているアスペルギルスニガーにより作られ、それを培地から単離することにより作られるが、蜂蜜等の純粋な天然製品が代用され得る。チオシアネートはナトリウムまたはカリウムとの塩として加えられるが、チオシアネートを含有するケイルまたは他のブラシカシーエ (Brassicaceae) またはシナピス (Sinapis) 生成物等の天然製品の形で加えることもできる。

調製例1

10%活性酸素を含有する過炭酸ナトリウムの顆粒	100g
チオシアン酸ナトリウム	40g
ラクトペルオキシダーゼ (50U/mg)	2g
ポリビニルピロリドン	10g
ラクトース	50g

ステアリン酸マグネシウム

10g

ラクトースオキシダーゼをラクトースと混合し、ポリビニルピロリドンの溶液を用いて顆粒化する。

過炭酸ナトリウムをラクトペルオキシダーゼの顆粒と混合する。ステアリン酸マグネシウムを加え、顆粒を錠剤に形成する。

錠剤は212mgの平均重量を有し、その投与を促進するために胃液により溶解されるポリマー被覆で被覆される。

調製例2

過酸化マグネシウム	50g
チオシアン酸ナトリウム	0.8g
ラクトペルオキシダーゼ (50U/mg)	0.04g
ポリビニルピロリドン	5g
ラクトース	100g
ステアリン酸マグネシウム	2g

3活性成分を、ポリビニルピロリドンを顆粒化物質として用いて別々に顆粒化する。ラクトースおよびステアリン酸マグネシウムを加えて混合物を錠剤に形成する。155mgの平均重量を有する得られた錠剤（100錠剤）を胃液可溶性のポリマーの溶液で被覆する。

調製例3

過酸化カルバミド	50g
チオシアン酸ナトリウム	20g
ラクトペルオキシダーゼ	1g
ラクトース	100g
ステアリン酸粉末	2g

過酸化カルバミドをイウドラジット エス (Eudragit S) を用いて顆粒化する。ラクトペルオキシダーゼをラクトースおよびチオシアン酸ナトリウムと混合し、混合物をイウドラジット エスにより顆粒化する。これら2種類の顆粒を混合し、ステアリン酸粉末と混合し、全混合物を平均重量が175gである錠剤に形成す

る。

調製例 4

I	過炭酸ナトリウム	100g
	マンニトール	20g
II	チオシアン酸ナトリウム	40g
	マンニトール	20g
III	ラクトペルオキシダーゼ (50U/ml)	2g
	マンニトール	20g

イウドラジット エス溶液を用いて上記のI、IIおよびIIIのそれぞれから顆粒を調製する。一緒にした顆粒を糖、ココア、マイクロカプセル化レモン香、またはそれらの混合物等と混合する。顆粒は、投与スプーンを用いて投与する。この顆粒は気密材料の中に充填される。

【図 1】

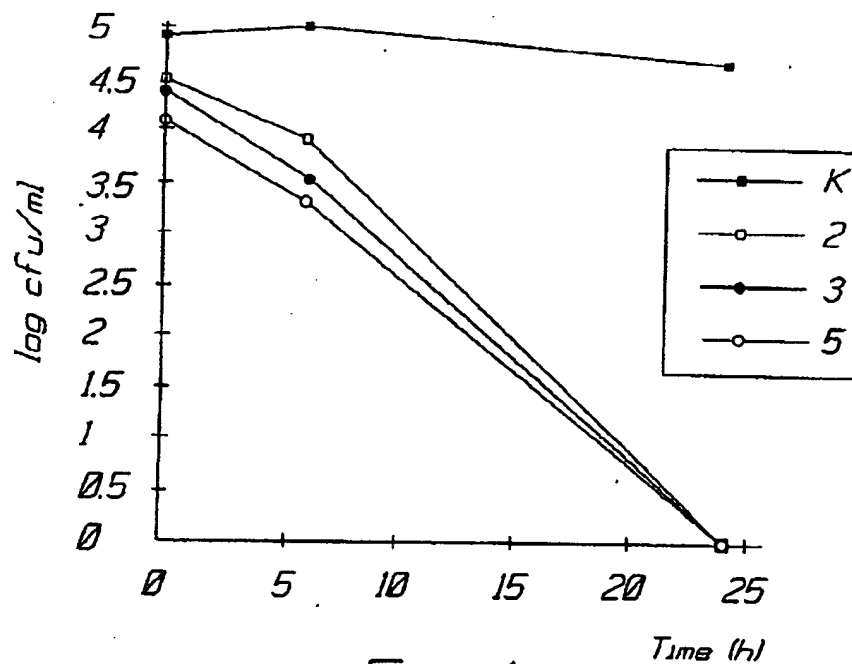


Fig. 1

【 图 2 】

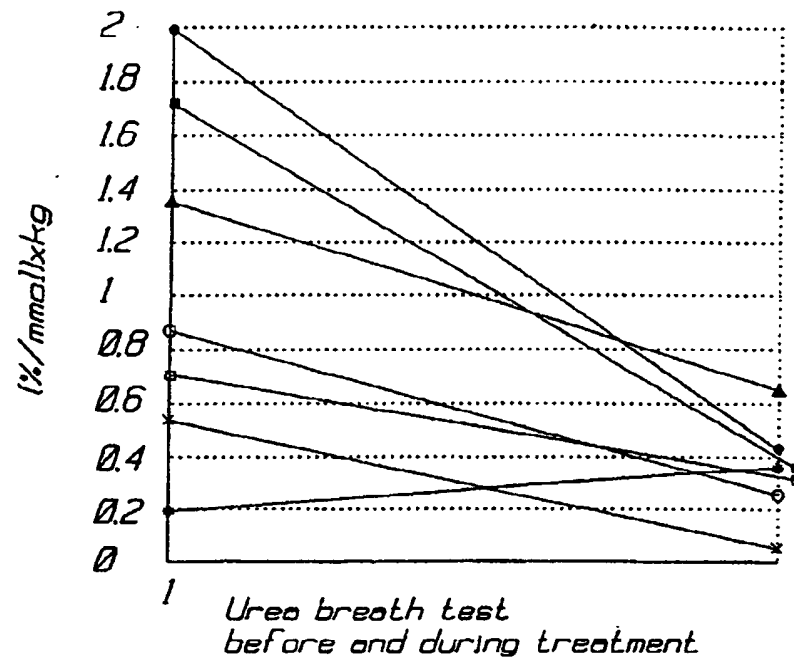


Fig. 2

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 97/00098

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: A61K 39/44, A61K 33/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, WPI, WPIL, CA, US PATENTS FULLTEXT DATABASES

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0397227 A1 (BIO SERAE LABORATORIES SA), 14 November 1990 (14.11.90) --	1-10
A	Dialog Information Services, file 5, BIOSIS, Dialog Accession No: 7195912, BIOSIS No: 88118657, BORCH E et al: "Antibacterial effect of the lacto- peroxidase thiocyanate hydrogen peroxide system against strains of campylobacter isolated from poultry"; J FOOD PROT 52 (9). 1989. 638-641 --	1-10
A	US 4320116 A (KARL E. L. BJÖRCK), 16 March 1982 (16.03.82) --	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 April 1997

Date of mailing of the international search report

08-05-1997

Name and mailing address of the ISA/

Swedish Patent Office

Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM

Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Carolina Palmcrantz

Telephone No. +46 8 782 25 00

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 97/00098

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 8802600 A1 (POULSEN, OTTO, MELCHIOR), 21 April 1988 (21.04.88) -- -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

International application No.

PCT/SE 97/00098

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0397227 A1	14/11/90	CA 2014847 A	12/11/90
		DE 69004329 D,T	19/05/94
		ES 2059990 T	16/11/94
		FR 2646777 A,B	16/11/90
		JP 3193708 A	23/08/91
		US 5206156 A	27/04/93
US 4320116 A	16/03/82	BE 852195 A	08/09/77
		DE 2709390 A,C	15/09/77
		FR 2345940 A,B	28/10/77
		GB 1546747 A	31/05/79
		KE 3224 A	03/09/82
		LJ 76904 A	14/07/77
		NL 7702083 A	12/09/77
		SE 420793 B,C	02/11/81
WO 8802600 A1	21/04/88	SE 7603075 A	09/09/77
		AU 8175087 A	06/05/88
		EP 0293407 A	07/12/88
		JP 1501000 T	06/04/89

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード' (参考)
A 6 1 P	1/02	A 6 1 K 31/00	6 0 1
	1/00		6 3 1 C
	31/04	31/26	
A 6 1 K	31/26	31/70	6 0 1
	31/7004	A 2 3 L 2/00	F
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN		



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A61K 38/44, 33/04	A1	(11) International Publication Number: WO 97/26908 (43) International Publication Date: 31 July 1997 (31.07.97)
(21) International Application Number: PCT/SE97/00098 (22) International Filing Date: 22 January 1997 (22.01.97) (30) Priority Data: 9600233-2 23 January 1996 (23.01.96) SE (71) Applicant (for all designated States except US): SEMPER AKTIEBOLAG [SE/SE]; Torsgatan 14, S-105 46 Stockholm (SE). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): CLAESSION, Carl, Olof [SE/SE]; Vakhalla Slafsta, S-755 94 Uppsala (SE). LIN- DEWALD, Gustaf [SE/SE]; Runnristarvägen 17, S-186 50 Vallentuna (SE). (74) Agent: AVELLAN-HULTMAN, Olle; Avellan-Hultman Patentbyrå AB, P.O. Box 5366, S-102 49 Stockholm (SE).		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i> <i>In English translation (filed in Swedish).</i>
(54) Title: USE OF LACTOPEROXIDASE, A PEROXIDE DONOR AND THIOCYANATE FOR THE MANUFACTURE OF A MEDICAMENT FOR TREATING HELICOBACTER PYLORI INFECTION (57) Abstract <p>Use of an antibacterial system comprising lactoperoxidase and a peroxide donor for preparing a preparation for prophylactic of therapeutic treatment "in vivo" of an infection caused by the bacteria <i>Helicobacter pylori</i> existing in the oral cavity, in the throat and in the stomach, which preparation is completed by the presence of thiocyanate in an antibacterial level, and eventually in the presence of lactoferrin. A daily dose for human treatment is 1.2-1.6 gram of the system taken 3 times a day.</p>		

Use of lactoperoxidase, a peroxide donor and thiocyanate for the manufacture of a medicament for treating *Helicobacter pylori* infection.

DESCRIPTION

Technical field

5 The present invention relates to the use of a known antibacterial system which is effective against infection of the bacteria *Helicobacter pylori*, which is found in the gastric mucosa and which is related to gastric ulcer.

10 The object of the present invention is to suggest a possibility of combatting the micro-organism *Helicobacter pylori*, which is a spiral formed, gram negative bacteria existing the human gastric mucosa and also between the cells and intracellularly in the gastric mucosa, which bacteria has been found having a connection to inflammation in ulcer (gastric ulcer disease).

15 Further characteristics will be evident from the following specification.

Background of the invention

It is known to use the enzyme lactoperoxidase in combination with a thiocyanate and a peroxide donor for extending the freshness of milk. It is also known, as for instance stated in the publication Dialog Information
20 Services, file 5, Biosis, Dialog Accession No 7195912, to treat certain bacteria of the genus *Campylobacter* with the same lactoperoxidase system by producing antibacterial compositions which are active in the gastro-intestinal system, against diarrhoea and other intestinal diseases. It is shown that the system has an active effect on *Campylobacter jejuni* and
25 *Campylobacter coli*. The patent EP 0 397 227 describes the use of a similar type of lactoperoxidase system for treatment of bacterial *Listeria*.

The enzyme lactoperoxidase which is used in said compositions is obtained and isolated from bovine milk, or more commonly from dried milk products. It is important, from stability viewpoint, that the enzyme has a pH
30 value of less than 6.5, for instance pH 3.25 - 6.

Sodium thiocyanate generally has been used as a source of thiocyanate. Alternatively it is possible to use thiocyanate formed from secondary metabolites of plants, preferably within the family Brassicaceae, for instance species of the genus *Brassica* (types of cabbage like kale) and
35 *Sinapis* (for instance mustard seed). It is important that the vegetable raw material is heat treated so that existing vegetable peroxidases are made

Several tests have shown that infection by *Campylobacter* is one of the most common reasons for sporadic enteritis causing inflammation in the first place of the small intestine. Probably the infection starts via a colonisation of the mucosa of the intestine. On the contrary there are no evidence that *Campylobacter* infects the ventricle mucosa. Normally an infection of *Campylobacter* does not need a medical treatment. The infection generally passes by itself without any medical treatment. In case there is a serious colitis caused by an infection of *Campylobacter*, however, the infection is to-day treated by means of antibiotics, for instance Norfloxacin or Erythromycin. Such treatment is quite different from treatment of infections of *Helicobacter pylori*, as will be evident from the following, and no prophylactic or therapeutic treatments of the respective bacteria are compatible.

On the contrary many studies have proved that there is a clear connection between infection by *Helicobacter pylori* and gastritis, gastric mucosa and gastric cancer. Studies have proved that the risque of obtaining an infection increases following ageing, and that 40-50% of the population which is about 50 years of age are infected by *Helicobacter pylori*, which bacteria is, in front of all, found in the mucosa layer of the stomach.

It is obviously the fact that the bacteria *Campylobacter* solely attacks the external layer of the mucosa, and that the bacteria *Campylobacter* passes through the oral cavity, the gullet or throat, the stomach and at least those parts of the intestine system located closest to the stomach without causing any infection.

The situation is actually the opposite as concerns the bacteria *Helicobacter pylori*, namely that the bacteria is found in the oral cavity, in the throat and in front of all in the stomach and can cause infection thereof, whereas said bacteria does not attack the intestinal system. The reason therefore probably is that *Helicobacter* penetrates in between the cells of the stomach and even into the cells of the gastric mucosa and attacks said cells intracellularly, and that the bacteria is capable of protecting itself underneath a thick layer of mucus in the gastric mucosa. Depending on the above mentioned intracellular penetration the bacteria also is protected against the action of antibiotics. Evidence that the bacteria penetrates intracellularly is found for instance in the publication Journal of Clinical Pathology, Vol. 47, p. 699-704, Noach L.A. "Electron microscopy study of association between

to the walls of the epithelial cells and changes the structure of mucus, and this makes the bacteria attack the cells intracellularly. Further, the bacteria secretes proteases which decompose proteins and fats and injuries mucus. The patient's reactions on infections give injuries on the adjacent cells but do
5 not cause any damages of the bacteria. Local hormonal disturbances lead to an increased production of acid.

For almost all patients who suffer from ulcus duodeni a gastritis can be traced, which has been induced by the bacteria *Helicobacter pylori*. In fact, 60-80% of the patients who suffer from ulcus ventriculi are infected by
10 *Helicobacter pylori*, but the connection is less than for ulcus duodeni.

As mentioned above infections by *Helicobacter pylori*, so far, have been treated by a triple treatment including treatment with bismuth, Metronidazol and alternatively Amoxocillin or Tetracyklin, or by a treatment comprising a H₂-receptor-blocker and two antibiotics. The first mentioned
15 treatment gives an insufficient result and often leads to several adverse effects. The last mentioned treatment gives 60-80% healing.

On the other side there is to-day a restrictive view as regards the use of antibiotics depending on the risque of creations of antibiotic resistant strains.
20 Therefore, there has been a desire for alternative forms of treatment.

Description of the present invention

So far there has not existed any simple and effective treatment against *Helicobacter pylori* except using the above mentioned triple treatment
25 including treatment with antibiotics.

It is therefore very surprising that it has shown possible to combat infections of *Helicobacter pylori* using a lactoperoxidase system of the initially mentioned type, by using, according to the invention, an antibacterial system comprising lactoperoxidase, a thiocyanate and a peroxide donor for
30 making a preparation for treatment of infections caused by *Helicobacter pylori* present in the oral cavity, in the throat and, in front of all, in the stomach, even against intracellular infection of the gastric mucosa.

It is often possible to treat various bacteria "in vitro", whereas it can be difficult or impossible to treat the same bacteria "in vivo". *Helicobacter*
35 *pylori* can be treated by means of a large variety of anti microbial substances "in vitro". In spite thereof it is difficult to exterminate the organism, even

in a Brucella broth, pH 6.0 for 2 days.

In the test procedure cells of the human epithelial cell line HEP-1 were infected for 12 hours. Extra cellular bacteria were killed by means of gentamicin (50 mg/l), and the various systems were added. The cells were lysed after 0.6 and 24 hours, see curve K in the diagram of the enclosed figure 1. In the figure curves are shown for the following system:

2. Glucoseoxidase + Lactoperoxidase + Glucose + SCN (active thiocyanate);
3. MgO_2 + Lactoperoxidase + Glucose + SCN;
5. Glucoseoxidase + Lactoperoxidase + Glucose + SCN + Lactoferrin.

As evident from figure 1 all bacteria *Helicobacter pylori* was exterminated in all of the above mentioned systems 2, 3 and 5. This shows that the system enters into the cells and kills all bacteria intracellularly.

It is conspicuous that the active component which is formed by the system, when solved in a liquid, is capable of penetrating into the cells and to kill the bacteria *Helicobacter pylori*.

The system also has been tested "in vivo" in a mouse model and in human bodies:

Mouse studies

In this model the above described "Lactoperoxidase system" has been tested. Further, the same antibacterial system has been tested completed with lactoferrin in order to find out if lactoferrin might potentiate the system.

Method: 30 mice were infected with *Helicobacter pylori*; 7 days after the bacteria was added it was checked that the mice had actually been infected; this was made by growth and verification of *Helicobacter pylori* by PCR-technics.

Thereafter the mice were divided into three groups with 10 mice in each group, a check group and two test groups; the mice in the first one of said test groups were given the above mentioned antibacterial lactoperoxidase system and the mice of the second test group were given the same system completed with lactoferrin.

The antibacterial system comprising lactoperoxidase, glucose, glucoseoxidase and thiocyanate was added. The system was supplied in dried form and was solved in water and was administrated 3 times a day with 0.1 ml per time for 7 days. Thereafter a new analysis was made of the

Table 2

Person	1	2	3	4	5	6	7
Before treatment	1.97	1.7	1.36	0.87	0.72	0.54	0.21
After treatment	0.45	0.42	0.67	0.29	0.34	0.06	0.36

The above indicated results must be considered very sensational and successful considering the fact that it has until now been necessary to make use of a treatment with two antibiotics in combination with an acid secretion inhibitor for exterminating the bacteria *Helicobacter pylori* "in vivo". Still, not even said so far practised very strong treatment has been 100% effective.

The intracellular tests, the mice tests and the human tests thus prove that the antibacterial system comprising lactoperoxidase, glucose, glucoseoxidase and thiocyanate is capable, not only in an "in vitro" system but also in an "in vivo" situation, to exterminate the bacteria *Helicobacter pylori*. It has been shown that this is possible in spite that said bacteria is peculiar in protecting itself under a thick mucus layer in the gastric mucosa and to penetrate intracellularly therein and to protect itself against antibiotics.

Above the lactoperoxidase system has been tested against *Helicobacter pylori*, strain NCTC 11637. Corresponding tests have been made against other strains of *Helicobacter pylori*, namely VBG H, SVA40, V44-2010, G57, 17874 Vac-A, H:72 and 88-23. The same good results were obtained.

As indicated above in connection to the human studies it is also possible to treat infections of the bacteria *Helicobacter pylori* by means of various preparations like as pure pharmaceutical preparations, but also as food stuffs like in various types of diets. From the latter type it is possible to prepare a wheat diet comprising crushed wheat, skim milk powder, soy meal, calcium caseinate, fats, fibres and emulsifiers to which has been added sodium thiocyanate, a peroxide donor, lactoperoxidase and SCN. It is also possible to make use of various milk products and to add thereto a peroxide donor, and it is likewise possible to make use of a type of cultured milk comprising peroxides producing lactobacilles. By special feeding of the milk producing animals it is also possible to provide an increase of the content of thiocyanate in the milk.

An example of a product is a porridge which is prepared in that a dose of the dried lactoperoxidase system, about 1.2 - 1.6 gram, is mixed with 3/4

Liquid preparations for oral administration can be present in the form of syrups or suspensions, for instance solutions containing 0.2 - 20 % by weight of the above described active substances together with ethanol, glycerol or propylene glycol. The peroxid donor thereby is added in the form of a micro capsuled product for preventing a releasing thereof prior to the administration.

The preparation of tablets is made according to common technics, which technics are well known to the expert, and so are methods for the preparation of granulate for filling of gelatine capsules.

The daily dose of the active system for peroral administration varies and depends on the type of administration, but as a general rule the dose is between 8-400 mg per day, as concerns the sodium thiocyanate, and 10-500 mg per day as concerns the sodium percarbonate.

The following table 3 gives a general view of the amount of active components suitable for use in various preparation types.

Table 3

Lactoperoxidase (25 U/mg)	5-150 mg/l
Glucose	at least 0.5 g/l *
Glucoseoxidase	2.0-15 mg/l *
Thiocyanate	3-50 mg/l

*) *glucose - glucoseoxidase is a peroxide donor. Glucose, however, should be present in such amount that the glucoseoxidase can provide peroxide. An amount of 2.0-15 mg/l glucoseoxidase corresponds to 5-8.5 ml/l glucose. It is also possible to add a solid peroxide donor which gives an equivalent amount of hydrogen peroxide upon reaction. Further a strain of peroxide producing Lactobacillus can be used for generating peroxide.*

Lactoperoxidase is added as a pure product, as milk powder, or as a whey product. Glucose oxidase is generally prepared by growing *Aspergillus niger* and isolation thereof from the medium, but a pure natural product like honey can be an alternative. The thiocyanate is added as a salt with sodium or potassium, but it can also be added in the form of a natural product like kale or another Brassicaceae or Sinapis product containing thiocyanate.

Preparation example 3

	Carbamide peroxide	50 g
	Sodium thiocyanate	20 g
	Lactoperoxidase	1 g
5	Lactose	100 g
	Stearic acid powder	2 g

10 The carbamide peroxide is granulated using Eudragit S. The lactoperoxidase is mixed with lactose and sodium thiocyanate, and the mixture is granulated by means of Eudragit S. The two granules are mixed and are mixed with the stearic acid powder, and the total mixture is formed to tablets, the average weight of which is 175 mg.

Preparation example 4

15	I	Sodium percarbonate	100 g
		Mannitol	20 g
	II	Sodium thiocyanate	40 g
		Mannitol	20 g
20	III	Lactoperoxidase (50 U/mg)	2 g
		Mannitol	20 g

25 A granulate is prepared from each of I, II and III above using an Eudragit S solution. The combined granulates are mixed with a taste giving substance like sugar, cocoa, microcapsuled lemon aroma, or mixtures thereof. The granulate is dosed by means of a dosing spoon. The granulate is packed in an air tight material.